

# СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Илия Николов Илиев,

катедра „Биохимия и микробиология” при ПУ „Паисий Хилендарски” – Пловдив

**Относно:** дисертационен труд на тема „**Микрофлора на храносмилателния тракт на охлюви от сем. *Helicidae***” представен от докторант Здравка Веселинова Колева от катедра „Обща и промишлена микробиология” към СУ „Св. Климент Охридски“ за придобиване на образователна и научна степен „ДОКТОР” по професионално направление по област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3 Биологически науки; научна специалност по Микробиология.

**Получени материали:** Дисертация, автореферат, списък с публикации по дисертацията, CD с материали по дисертацията.

Със заповед № РД 38-88/03.02.2015г. на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“ съм определен за член на научно жури за защита на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор” от докторант Здравка Веселинова Колева на тема „**Микрофлора на храносмилателния тракт на охлюви от сем. *Helicidae***”. Дисертационният труд е разработен в катедра „Обща и промишлена микробиология” към СУ „Св. Климент Охридски“ и е оформен по стандартен за България модел. Дисертацията е написана на 199 стандартни машинописни страници и съдържа следните основни глави: Увод – 2 стр., Литературен обзор – 46 стр., Цел и задачи – 1 стр., Материали и методи – 16 стр., Резултати и обсъждане – 82 стр., Дискусия – 6 стр., Изводи – 1 стр., Литература – 29 стр., Приноси – 1 стр. Литературните данни и резултатите са старателно онагледени с 36 фигури и 22 таблици. При разработването и описването на дисертацията, дисертантката е ползвала много голям брой литературни източници общо 316, от които само един на кирилица и 315 на латиница.

Предлаганата дисертационна работа е по актуална тематика в областта на хранителната микробиология и микробиологичния контрол на храни. Както съвсем точно отбелязва докторантката информацията за микрофлората на охлювите е от една страна от ключово значение за тяхното широко използване в

сфери като фармация, козметика, медицина и др. От друга страна данните за микрофлората на чревния тракт на *C. aspersum* е важно, както за крайните консуматори, така и за по-ефективното отглеждане на охлювите във фермерите и намаляване на рисковете от заболявания. В литературния обзор докторантката предоставя актуална информация разпределена в три раздела: биология на охлювите; характеристика на гастро-интестиналната микробиота на охлювите и съвременни методи за идентификация на микроорганизми. Литературният обзор завършва със заключение, което обосновава важността на настоящото изследване за контрола на здравословния статус на охлювите и за микробиологичния контрол на месото им при консумация от човека.

В резултат на направения литературен обзор, авторката на дисертцията ясно формулира целта на изследването, която е постигната при решаването на четири добре обосновани задачи. Те обхващат четири различни етапа от таксономията на микроорганизмите, населяващи интестиналния тракт на охлювите.

В раздел „Материали и методи” са описани прецизно основните методи, които са прилагани при изпълнението на поставените задачи в дисертацията. По време на разработването на дисертационния труд дисертантката е усвоила голям брой както класически, така и съвременни микробиологични, генетични, молекулярно-биологични и биохимични методи, което е основание да се счита че е придобила необходимия методичен опит при извеждане на научен експеримент.

Резултатите от направените изследвания са представени детайлно в раздел „Резултати и обсъждане” и онагледени в 20 таблици и 32 фигури. В първият етап от своето изследване докторантката съвсем удачно е провела охарактеризиране на микробното разнообразие на гастро-интестиналния тракт на охлювите през различните фази на развитието им, използвайки метода ARDRA. Докторантката Здравка Колева установява, че микробиотата в интестиналния тракт на охлювите се влияе от сезонната ритмика. Втората част от изследване е посветено на динамиката на култивируемите микроорганизми в интестиналния тракт на *C. aspersum*. Използвайки различни селективни хранителни среди за култивиране на микроорганизми, авторката установява числеността на ентеробактерии, ентерококи, млечнокисели бактерии, бактерии от родовете *Salmonella*, *Shigella*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Clostridium* в четирите фази на развитието им – новоизлюпени, активно хранещи се, в аестивация и в хибернация. Определен е и броят на амилोलитичните, протеолитичните и целулозоразграждащите микроорганизми. В следващия етап от експерименталната работа докторантката е идентифицирала изолираните Грам-отрицателни и Грам-положителни бактерии, като е използвала биохимични и молекулярно-биологични методи.

Извършена е огромна по обем работа, в резултат на която са идентифицирани щамове, принадлежащи към 9 вида Грам-отрицателни и 10 вида Грам-положителни бактерии. При изучаване на Грам-положителните бактерии докторантката се е насочила към идентификация на млечнокисели бактерии с оглед на тяхната перспективност при използването на антибактериалните им свойства. В тази връзка авторката специално е изследвала антимикробните свойства на изолираните млечнокисели бактерии срещу различни патогенни микроорганизми. В последния етап на изследването Здравка Колева е приложила метагеномен анализ на тоталната микробиота в гастро-интестиналния тракт на охлювите, чрез който разкрива динамиката на микробното многообразие в различните фази на развитие на охлювите.

Всички резултати са представени и дискутирани в отделните глави от раздела „Резултати и обсъждане”, които логично следват хода на решаването на поставените задачи. Необходимо е да се отбележи факта, че докторантката представя в отделна глава обобщена дискусия на резултатите, чрез която прави опит да изведе основните тенденции от проведеня мащабен таксономичен експеримент. В резултат на експерименталната работа са формулирани 7 основни извода.

Основни научни приноси на дисертационния труд според мен са:

- 1 Разработен е алгоритъм за проследяване динамиката на микробната популация в интестиналния тракт на охлювите *C. aspersum* в зависимост от етапите на тяхното развитие.
- 2 Въз основа на полиморфизма на спейсърните участъци на интестинални Грам-отрицатели бактерии от сем. *Enterobacteriaceae* изолирани от охлювите *C. aspersum* е създадена база данни, която може да се използва в сравнителни таксономични изследвания.
- 3 За първи път е приложен метагеномен анализ за установяване на динамиката и биоразнообразието на бактериалната микрофлора на храносмилателния тракт на охлювите от вида *C. aspersum*.
- 4 За първи път от интестиналния тракт на *C. aspersum* се доказват 10 вида Грам-положителни бактерии - *L. brevis*, *L. graminis*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *L. gelidum*, *V. penali*, *W. confusa* и *R. erythropolis* и 9 вида Грам-отрицателни бактерии - *B. agrestis*, *A. oleivorans*, *K. cryocrescens*, *K. ascorbata*, *R. planticola*, *P. carotovorum*, *P. chrysanthemii*, *E. kobei* и *L. amnigena*.

Дисертацията, независимо от обема си, е написана на ясен и стегнат научен език. Авторефератът отговаря напълно на целите, задачите и постигнатите резултати в дисертационния труд.

Резултатите от дисертацията са публикувани в три научни публикации, две от които в международни реферирани списания (Biotechnol & Biotechnol Eq.; Journal of Bioscience and Biotechnology), една от които в списание с импакт фактор. В две от публикациите докторантката е първи автор. Резултатите от дисертацията са представени и на три научни форума. Експерименталната работа в дисертацията е част от изпълнението на два научни проекта.

Към докторатката имам следните въпроси:

1. В първоначалната схема за изолиране на култивируемите микроорганизми от интестиналния тракт на охлювите Вие използвате хранителна среда МПБ. Мислите ли, че по този начин сте успели да изолирате всички култивируеми микроорганизми? Защо не сте изолирали и отчели количеството на дрожди и плесенни гъби?
2. Възможно ли е прилаганата от Вас схема за изолиране на микроорганизми да се използва за изолиране на щамове секретирателни специфични ензими?

Към докторатката имам следните препоръки:

1. Някои от данните (например таблица 15) са представени твърде неясно, което обезмисля до известна степен наличието им.
2. Би било добре да се представи схема на последователността при идентифициране на изолираните щамове, която би ориентирала бъдещите ползватели на резултатите на дисертацията.

**Заключение:**

**Оценката ми за дисертационния труд, автореферата, научните публикации и научните приноси на докторантката Здравка Веселинова Колева е положителна. Въпреки направените препоръки, бих искал да отбележа още веднаж достойнствата ѝ – на първо място една мащабна по размер изследователска работа, надхвърляща значително необходимия минимум за една дисертация, съдържаща огромно количество резултати, правилно интерпретирани и обобщени в**

**предложения алгоритъм за метагеномен анализ на интестиналната микрофлора на охлювите.**

Представената дисертация напълно отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото прилагане. Постигнатите резултати ми дават основание да предложа да бъде присъдена образователна и научна степен „доктор” на **Здравка Веселинова Колева** по професионално направление по област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3 Биологически науки; научна специалност по Микробиология.

05.03.2015г.

Изготвил:

Пловдив

(проф. д-р Илия Илиев)